

地方衛生研究所と連携して実施した下水中の新型コロナウイルスの検出結果について

ポリオ環境水サーベイランスを活用した新型コロナウイルス調査*

令和2年度の調査結果

下水試料等の感染性について

国立感染症研究所ウイルス第二部
主任研究官 吉田 弘

*

R2年度「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築するための研究」研究代表者 吉田弘
R3年度「新型コロナウイルス感染症等の感染症サーベイランス体制の抜本的拡充に向けた人材育成と感染症疫学的手法の開発研究」研究代表者 鈴木基 分担研究 吉田弘「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制の構築に関する研究」

ポリオ環境水サーベイランスを活用した新型コロナウイルス検出（R2年度）

・下水処理場（人口数万-100万人を対象）

既存のポリオウイルス検査のフロー

濃縮により10万人当たり1名～数名の感染者を捕捉可能（ポリオは確立）

全国19カ所で調査を実施
北海道、青森、岩手、福島、千葉、山梨、東京、（横浜）、静岡、愛知、岐阜、富山、奈良、和歌山、大阪、（堺）、岡山、佐賀、福岡

流入下水の採水
（月1回、0.5Lを目安）

遠心
（微粒子除去）

遠心上清

塩化マグネシウム添加
pHを調整

陰電荷膜にろ過吸着

陰電荷膜から誘出

遠心・ろ過
（微粒子の除去）

濃縮液

ポリオウイルス分離/同定

既存のポリオ検査フローに基づき新型コロナウイルス検出のための新しい処理フローの構築

新型コロナウイルス検出の新たなフロー

沈澱物からRNA抽出、検査

12か所が参加（23処理場で調査）
青森、岩手、福島、千葉、埼玉、（東京）、横浜、愛知、岐阜、富山、和歌山、岡山、福岡

課題対応（研究班で対応）
糞便中の新型コロナウイルス量は少ない
（ノロ等に比べ2-3log低い）等

○検査手法の改良
・新型コロナウイルス検出のための濃縮条件の検討
・反応条件（プライマー等）の変更
等

○調査対象の検討
・適正な処理場のサイズ（感染者数と下水中のウイルス量の関係）
・採水頻度
・ハイリスク施設における直接採水（希釈の影響をあまり受けないため）
・検出時の対応
等

新型コロナウイルスの検出（qPCR）

環境水調査における新型コロナウイルスとポリオウイルスの比較

	ポリオウイルス	SARS-CoV-2
ウイルスの特徴	エンベロープなし (非常に安定。耐酸性。アルコール耐性。塩素系消毒剤が滅菌に効果的)	エンベロープあり (脂質に覆われており、水中では不安定。界面活性剤、酸、アルコールで不活化)
排出パターン	糞便に大量に排出	感染者の半分程度が排出、ウイルス量はポリオより2-3log少ない
感染の特徴	不顕性感染が多いこと。 糞便への排出期間は2-3週間 (もっと長い場合もある)	
ワクチン	不活化ワクチン (IPV) 生ワクチン (OPV)	mRNAワクチン、アデノウイルスベクターワクチン、不活化ワクチン等
感染症法上の分類	2類感染症	新型インフルエンザ等感染症
日本国内の調査	19自治体 (23処理場)	12自治体 (21処理場)
海外の調査状況	WHOによる世界ポリオ根絶計画のもとで実施 (下水、河川等)	下水網を有する国にて調査、研究
検査方法	ウイルス分離	リアルタイムPCR検査

流入下水中の新型コロナウイルス調査のフロー

下水中の新型コロナウイルス検出マニュアル

https://www.niid.go.jp/niid/images/vir2/polio/SC2_sewage_manual_1.pdf

流入下水 (約 250~500 mL)

3,000 × g, 4°C、30 分間遠心

沈殿物

RNeasyPower Soil Total RNA kit を使用して Total RNA を抽出。

リアルタイム PCR により下記のウイルスの核酸定量を行う。

- ① SARS-CoV-2 ゲノム検出 (N1N2領域)
- ② Pepper mild mottle virus (PMMoV:プロセスコントロールとして使用)

上清

上清に 2.5 M MgCl₂ 溶液を最終濃度 0.05 M になるよう加える。

攪拌しながら 0.5 N HCl を加え、pH 3.5 に調整する。

47 mm の陰電荷膜でろ過する。

3% ビーフエキスでウイルスを誘出する。(50~100 倍濃縮)

誘出液 1 mL を使用して RNA を抽出・精製する。

リアルタイム PCR による核酸定量を行う。

- ③ SARS-CoV-2 ゲノム
- ④ Pepper mild mottle virus (PMMoV)

沈殿物抽出法

新型コロナウイルス
ゲノム検出



結果の比較



陰電荷膜濃縮法

ポリオウイルス検出 (細胞による分離) をメイン。
残余濃縮物を新型コロナウイルスゲノム検出に使用

全国12自治体（23処理場）における調査結果

1. 検出結果
2. 処理区人口別の比較
3. 某政令市（5箇所、週1回採水）での調査結果.....

R2年度「環境水を用いた新型コロナウイルス監視体制を構築するための研究」班報告書より

1.検出結果

2020年7月～2021年2月における処理場ごとの検出結果（※：検出限界値付近での検出[1]）

自治体	処理場	療養施設[2]	商業集積地 事業所数[3]									
				7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	
A	①	あり (R2.5～)	794	沈殿物				なし	なし	なし	なし	なし
				濃縮物				なし	なし	なし	なし	なし
B	②	公表なし/ 不明	1,159	沈殿物				なし	あり※	あり※	あり※	
				濃縮物				なし	なし	なし	なし	
C	③	なし	1,340	沈殿物		なし	あり※	なし	あり※	あり※	なし	なし
				濃縮物		なし	なし	なし	あり	あり	あり※	なし
	④	なし	1,325	沈殿物				なし	なし	あり※	あり※	あり※
				濃縮物				あり※	なし	なし	あり	あり
D	⑤	あり (R2.12～)	802	沈殿物				なし	なし	なし	なし	なし
				濃縮物				なし	なし	なし	なし	なし

[1] 検出限界値は使用した下水試料量とRNA抽出キットより算出。リアルタイムPCRの検出感度を5GC/5 μ lとし、各検出限界値の10倍までの値については検出限界値付近での検出とした。

[2] 新型コロナウイルス陽性者の療養施設の有無について各自治体のホームページを参考に情報を収集

[3] 商業集積地とは、都市計画法第8条に定める「用途地域」のうち、近隣商業地域及び商業地域であって、商店街を形成している地域をいう。概ね一つの商店街を一つの商業集積地区とする。一つの商店街とは、小売店、飲食店及びサービス業が近接して30店舗以上あるものをいう。また、「一つの商店街」の定義に該当するショッピングセンターや多事業所ビル(駅ビル、寄合百貨店等)は、原則として一つの商業集積地区とする。

自治体	処理場	療養施設[2]	商業集積地 事業所数[3]		7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月
D	⑥	あり (R2.6~/12 ~)	2,955	沈殿物				なし	なし	なし	なし	なし
				濃縮物				なし	なし	なし	なし	なし
	⑦	あり (R2.5~/12 ~)	4,472	沈殿物				なし	なし	なし	なし	なし
				濃縮物				なし	なし	なし	なし	なし
E	⑧	あり (R2.4~/12 ~)	1,031	沈殿物			なし	なし	なし	なし	あり※	あり※
				濃縮物				なし	なし	なし	なし	あり※
	⑨	あり (R2.4~/5~ R3.1/8~12/ R3.1~)	4,049	沈殿物			なし	なし	なし	あり	なし	なし
				濃縮物						あり	なし	なし
F	⑩	あり (R2.5~)	3,320	沈殿物				あり※	あり	あり	あり	あり
				濃縮物				なし	あり※	あり※	あり※	あり※
	⑪	あり (R2.8~)	1,562	沈殿物				あり	あり	あり	あり	あり
				濃縮物				あり	あり※	あり※	あり※	あり※
	⑫	あり (R2.9~)	3,683	沈殿物				あり	あり	あり	あり	あり
				濃縮物				あり	あり※	あり※	あり※	なし
	⑬	なし	1,679	沈殿物				あり※	あり※	あり	あり	あり※
				濃縮物				なし	あり※	あり※	あり※	なし
⑭	なし	1,074	沈殿物				あり※	あり※	あり※	あり	あり※	
			濃縮物				なし	あり※	あり※	あり※	あり※	

全国12自治体（23処理場）における調査結果（まとめ）

検体の処理法 と延べ検体数	分類（分析結果）		
	検出なし	検出限界値 付近での検出*	検出あり
沈殿物抽出法 (224)	98	86	40
上清 陰電荷膜法 (181)	136	41	4
PEG法 (40)	30	4	6

*検出限界値は使用した下水試料量（250-500ml）とRNA抽出キットより算出（下記参照）。リアルタイムPCRの検出感度を5GC/5 μ lとし、各検出限界の10倍までの値については検出限界値付近での検出とした。

分担研究「終末処理場の流入水沈査からのRNA抽出方法の検討」 濱崎光宏(福岡県保健環境研究所)より

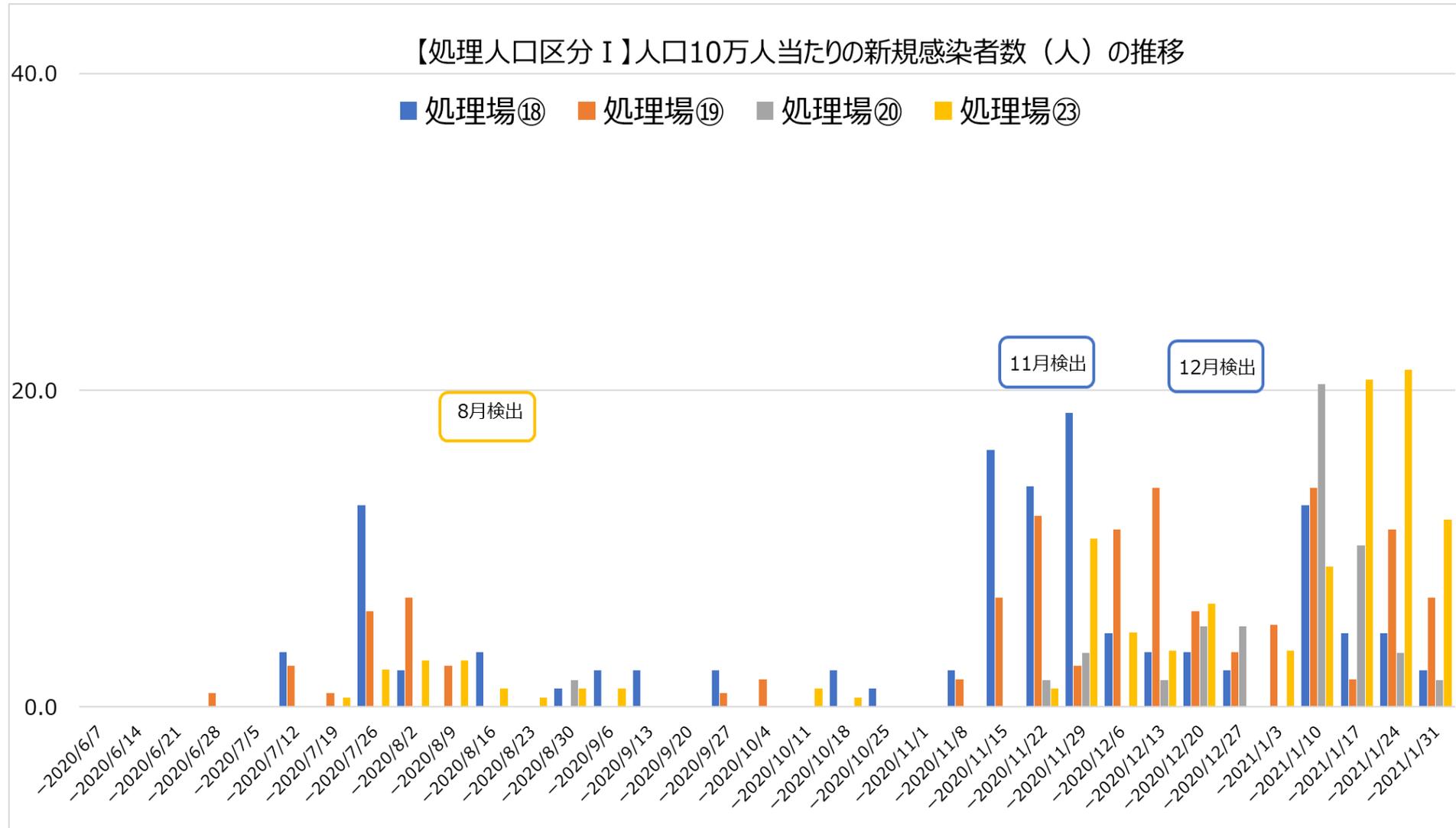
表2 リアルタイムPCRの検出限界値を5コピーとしたときの各RNA抽出キットの流入水1L当たりの限界値

終末処理場の流入水の沈殿物				陰電化膜濃縮	
RNeasy PowerSoil Total RNA kit	Stool Total RNA Purification kit	QIAamp Viral RNA Mini kit	QIAamp UltraSens Virus kit	QIAamp UltraSens Virus kit	
2.50E+02	7.50E+03	1.07E+04	1.50E+03	3.00E+02	

2 処理区人口別の比較

10万人未満の処理区域

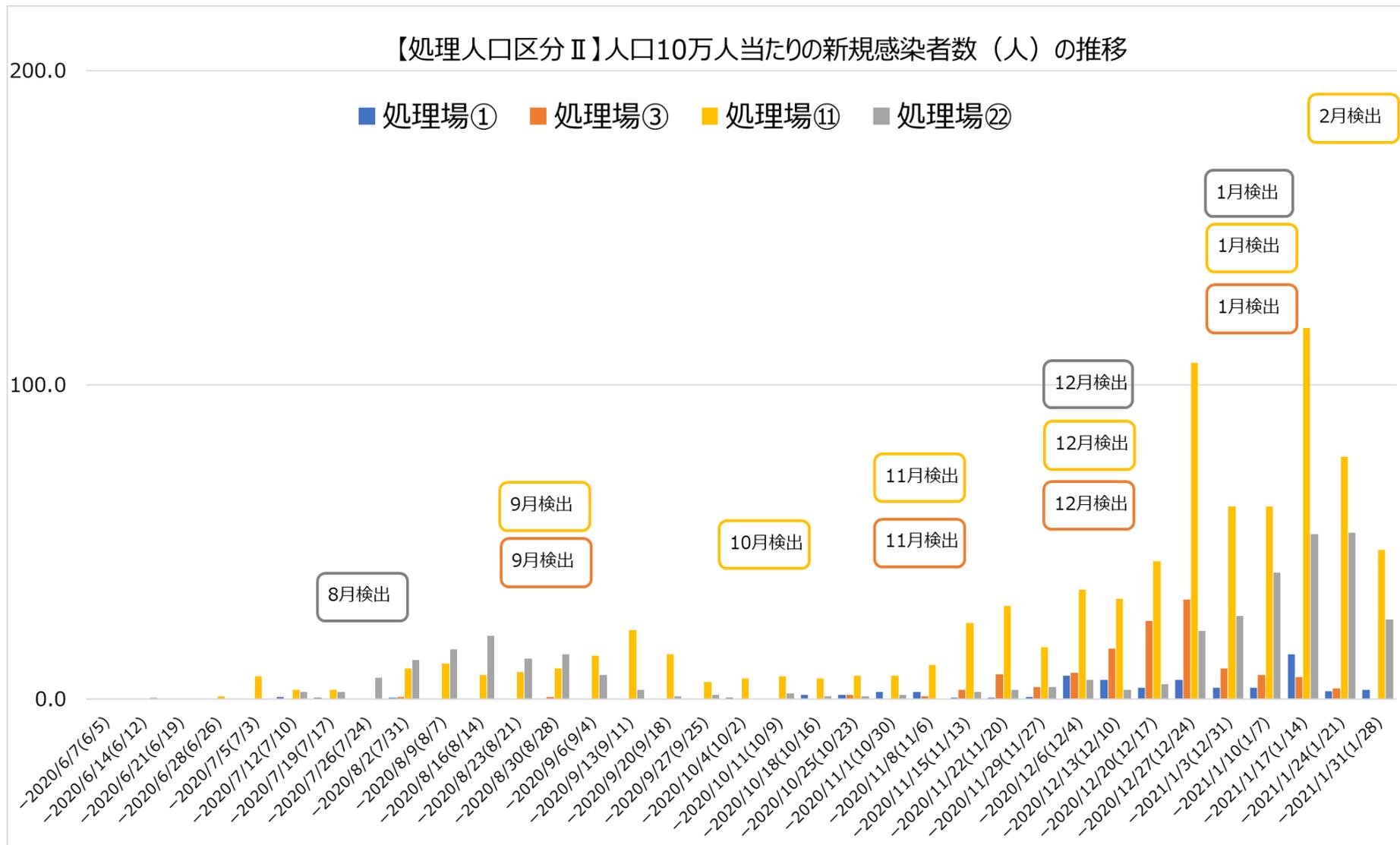
- 処理区人口別に、新規感染者数の公表情報と下水中の新型コロナウイルス検出結果の推移を比較。
- 人口10万人未満の処理区では、新規感染者数の増加につれ沈殿物より新型コロナウイルスを検出。
- 1週間の新規感染者数が5人程度であっても検出されている（処理場⑳8月）。



• 注釈) コロナウイルスの検出結果は図中に「○月検出」として記載し、その枠線色は棒グラフの各処理場の凡例色と同じものとした。

10～20万人の処理区域

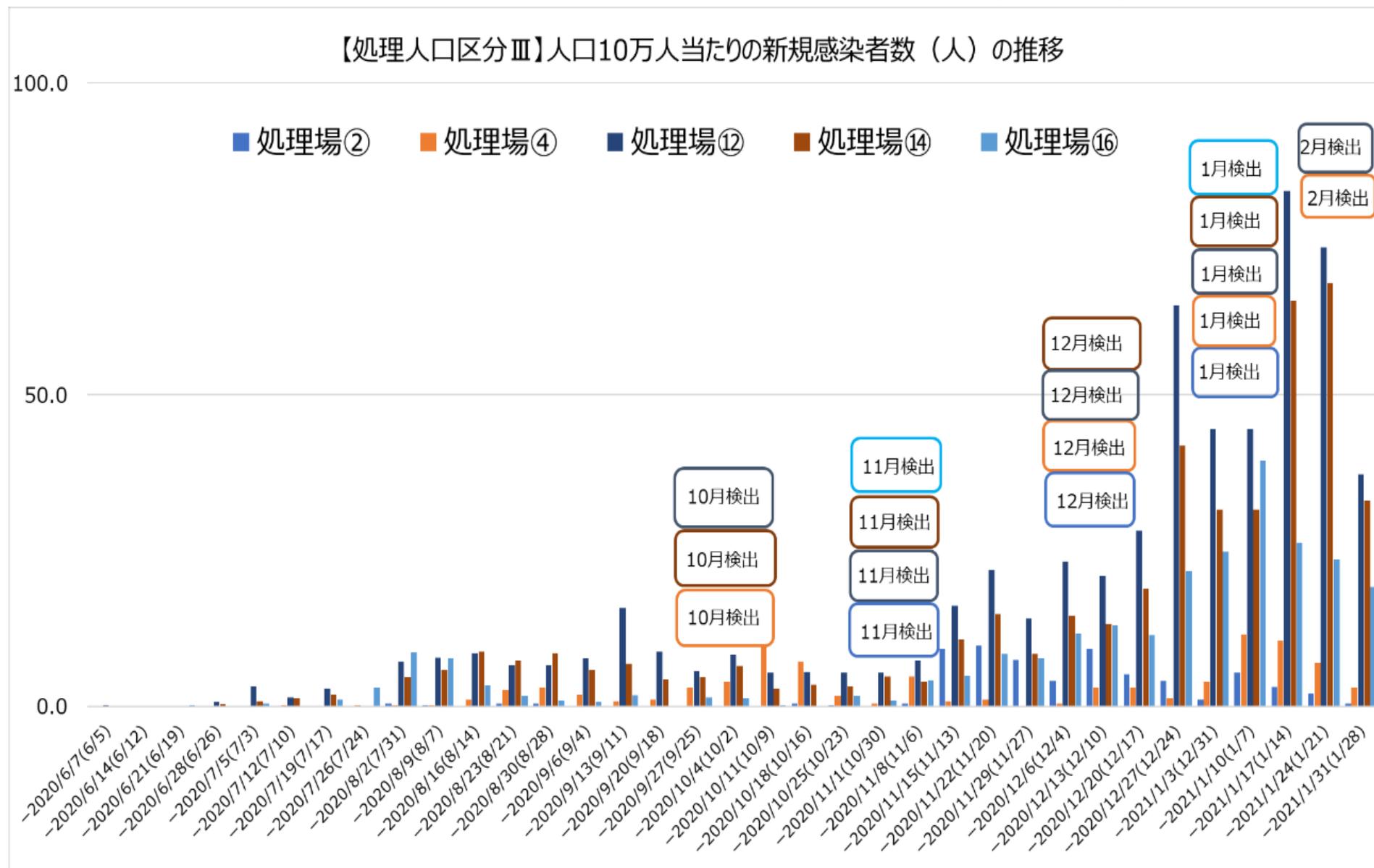
- 10～20万人の処理区域でも、新規感染者数の増加につれ沈殿物より新型コロナウイルスを検出。
- 公表新規感染者数の多い処理区では継続して検出（処理場⑪）。
- 公表新規感染者数が週に1～2名であっても検出されている（処理場③9月）。



注釈) コロナウイルスの検出結果は図中に「○月検出」として記載し、その枠線色は棒グラフの各処理場の凡例色と同じものとした。

20～50万人の処理区域

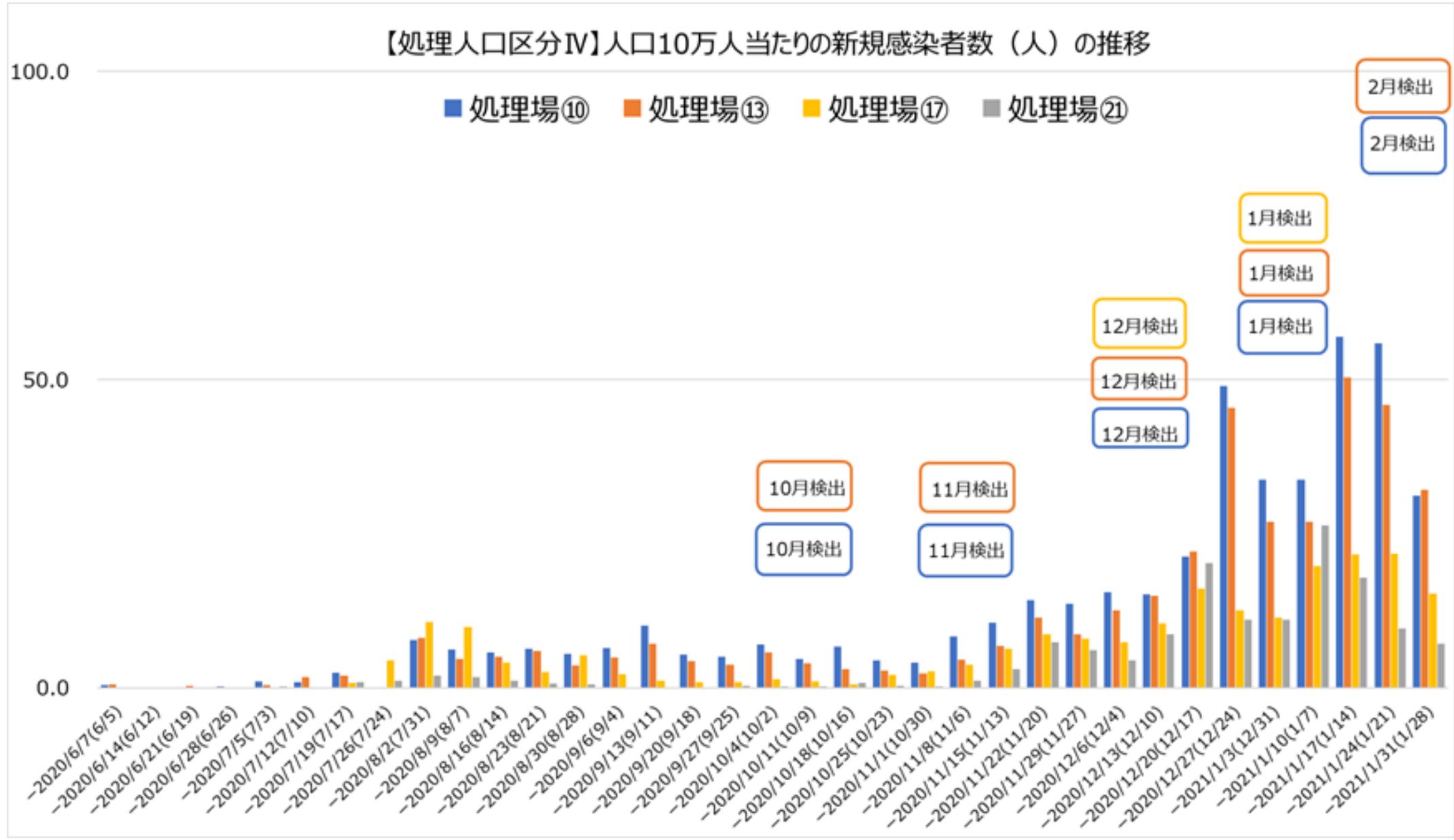
- 20～50万人の処理区域でも、新規感染者数の増加につれ沈殿物より新型コロナウイルスを検出。
- 公表新規感染者数が週に20名程度であっても検出されている（処理場④10月）。



注釈) コロナウイルスの検出結果は図中に「○月検出」として記載し、その枠線色は棒グラフの各処理場の凡例色と同じものとした。

50～100万人の処理区域

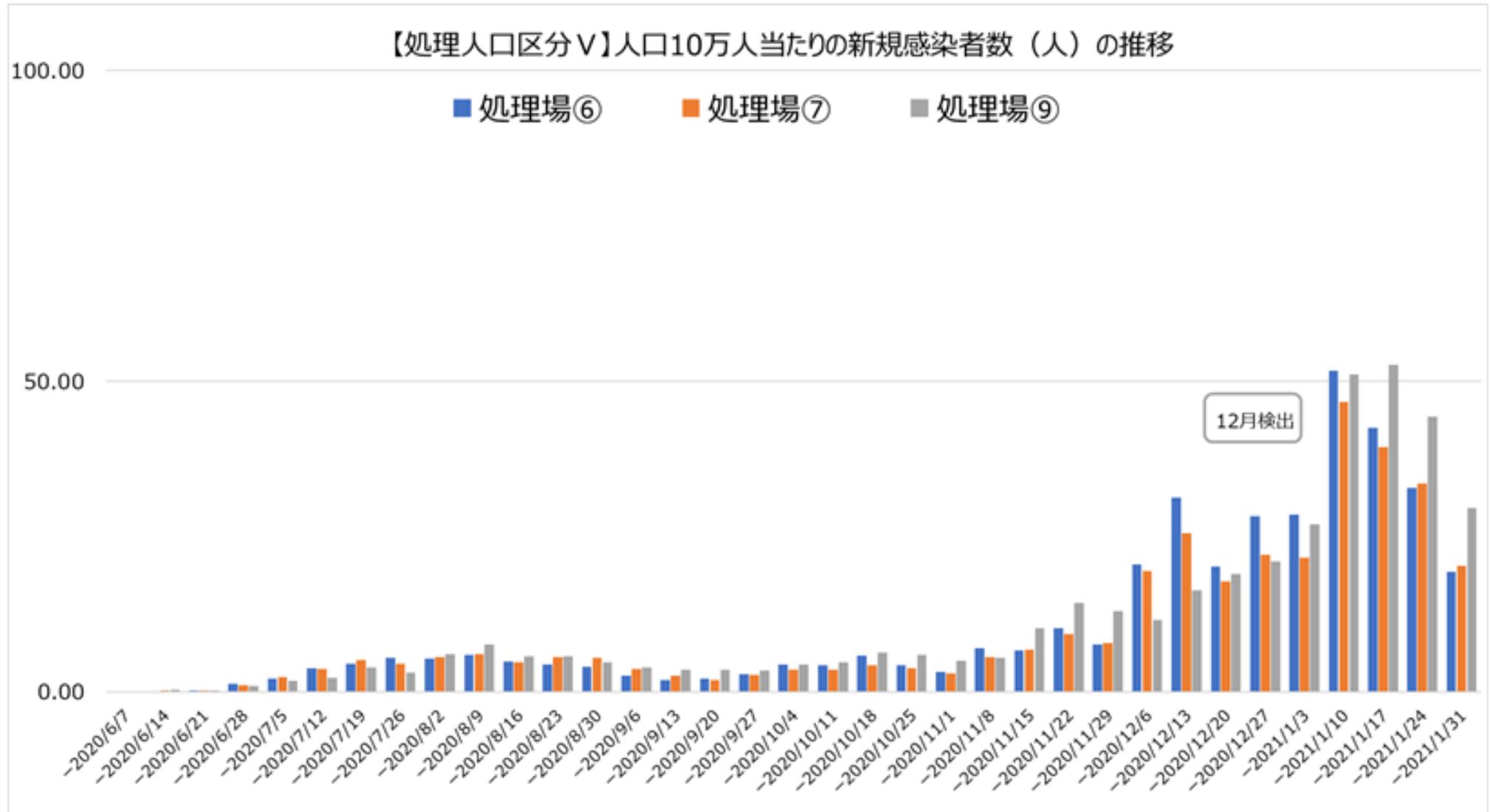
- 50～100万人の処理区域でも、新規感染者数の増加につれ沈殿物より新型コロナウイルスを検出。
- 公表新規感染者数は、週に30名～100名程度の場合に検出されている（処理場⑩、⑬10月）。



注釈) コロナウイルスの検出結果は図中に「○月検出」として記載し、その枠線色は棒グラフの各処理場の凡例色と同じものとした。

100万人以上の処理区域

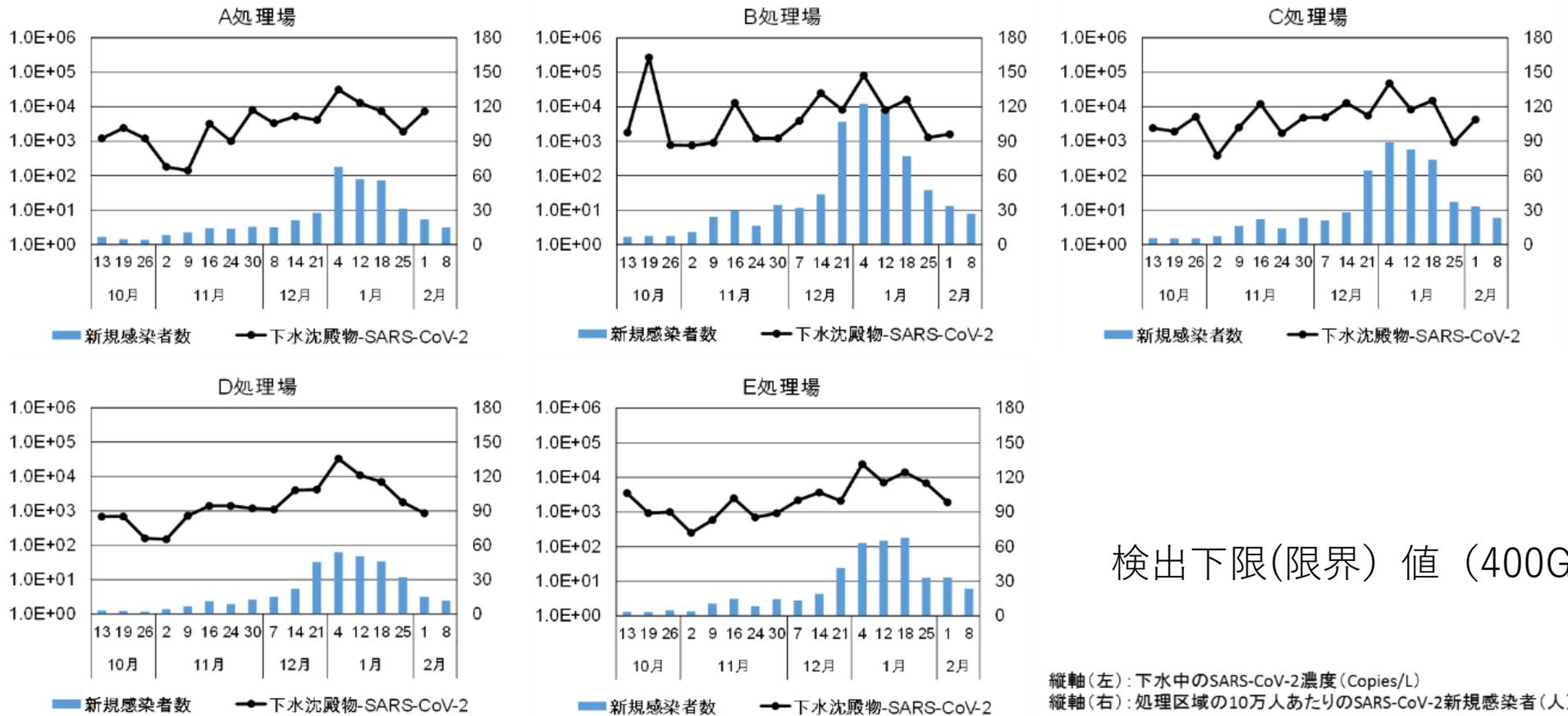
- 100万人以上の処理区域では、新規感染者数が増加しても新型コロナウイルスが検出されず。
- 公表新規感染者数が週に300名～500名程度の場合に検出されている（処理場⑨12月）。



注釈) コロナウイルスの検出結果は図中に「○月検出」として記載し、その枠線色は棒グラフの各処理場の凡例色と同じものとした。

某政令市での調査結果（R2.10~R3.2月までの調査結果：5か所、週1回採水）

地点	処理人口	感染症指定医療機関の有無	軽症者等宿泊療養施設有無	商業集積地事業所数
A	約560,000	あり	あり（R2.5~）	3,320
B	約110,000	なし	あり（R2.8~）	1,562
C	約360,000	なし	あり（R2.9~）	3,683
D	約610,000	なし	なし	1,679
E	約390,000	あり	なし	1,074



下水沈殿物中のSARS-CoV-2濃度の推移と10万人当たり処理地域の新規感染者の関係

新規感染者数: 採水日の属する週の7日間の合計感染者数を採水日に示した。
 12/28と1/4は2週間分の合算を1/4に示す。

まとめ

令和2年度に実施した12地方衛生研究所の調査結果

- ・ 延べ23下水処理場における調査結果は下水中のウイルス量はCOVID-19流行期でも少量であることを示した。
- ・ 沈殿物を用いるウイルス検出法の有用性が示された。
- ・ しかし一部の施設で遠心上清を用いた陰電荷膜濃縮法、PEG沈殿法が良好な場合もあり、検出材料と濃縮法の追加検討の必要性が認められた。

下水の感染性

- ・ VeroE6・TMPRSS2細胞によるウイルス分離を試みたがSARS-CoV-2は分離できなかった。

採水頻度の検討

- ・ 民間検査機関を利用し5か所の処理場で週1回の採水頻度で調査したところ、下水中SARS-CoV-2濃度は感染者数の増減との間に相関が認められた。

技術面

- 沈殿物のRNA抽出：海外製商業キットの入荷不安定→代替法も今後検討
- 検出法の改良（リアルタイムPCR用プライマーセット、反応条件の検討による感度向上）
- 検査プロセスの見直し
- データ解析方法の検討
- 感染者数と下水中のウイルス量についてのデータ蓄積、評価

運用面

- 情報共有範囲と共有方法、内容についての検討
- 検出時の追加調査
- 民間検査の活用、行政検査機関の役割（精度管理等）

下水の感染リスクなど

下水処理の有無にかかわらず下水道を介してヒトに感染した知見はない

コロナウイルスは塩素消毒で不活化できる。

世界保健機関（WHO）、国連児童基金（UNICEF）新型コロナウイルス（COVID-19 ウイルス）に関する水、衛生、廃棄物の管理 暫定ガイダンス（国立保健医療科学院生活環境研究部 仮訳）

https://www.niph.go.jp/soshiki/suido/pdf/r02covid19/WHO-2019-nCoV-IPC_WASH-2020423_JP_0430.pdf

令和2年に実施した東京都における下水沈殿物と濃縮物のウイルス分離試験結果*

流入水でPCRでフラグメントを検出できてもウイルス分離は陰性

放流水はPCR,ウイルス分離とも陰性

*Nagashima M, Kawakami M,, Hayashi H, et al, RNA detection by RT-qPCR and non-isolation of SARS-CoV-2 in concentrated wastewater (June–August 2020, Tokyo), JJID.2021 (in press) <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2021.055>,

水道水の場合：処理前の検査で想定される留意点

- 国内の流入下水の沈殿物のウイルスゲノム量は臨床材料に比べて、きわめて少量。ただしsolid画分から高頻度にウイルスゲノムが検出されている。
- COVID-19の流行期に未処理の汚水が流入する河川水を水源とする場合、処理前の沈殿物には微量のウイルスゲノムが存在する可能性があることから、検査にはBSL2の安全キャビネット内の作業が望ましい。またウイルス量は極めて少ないことが想定されるためリアルタイムPCR反応時の交差汚染防止の対応を取ること望まれる。